

УДК 619:616-071:616.9:579.882:636.1-9:575.112:577.2

© 2017

Ксьонз І. М., доктор ветеринарних наук

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН

Корнієнко М. В., аспірант

(науковий керівник – доктор ветеринарних наук І. М. Ксьонз)

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

ВИДОВЕ ДИФЕРЕНЦЮВАННЯ ЗБУДНИКІВ ХЛАМІДІОЗІВ ТВАРИН ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Рецензент – доктор ветеринарних наук, професор С. М. Кулинич

Розроблено десять ПЛР-тест-систем для видового диференціювання бактерій роду *Chlamydia*, що є етіологічними чинниками хламідіозів ссавців і птахів, а саме: *C. abortus*, *C. avium*, *C. caviae*, *C. gallinaceae*, *C. muridarum*, *C. felis*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* та *C. suis*. Базовими є сконструйовані і синтезовані десять пар олігонуклеотидних праймерів, що фланкують різні за розміром фрагменти ДНК гена основного мембранного білку (МOMP) хламідії. Специфічність розроблених ПЛР-тест-систем підтверджена результатами отриманими за допомогою сайту «Bio.bsu.by» і комп'ютерної програми «Blast» та результатами досліджень за методом ПЛР 17 зразків біологічних матеріалів, з яких 11 є зразками контрольних ДНК бактерій роду *Chlamydia*, а 6 зразками ДНК лептоспир та бабезій.

Ключові слова: хламідії, МOMP, ПЛР-тест-система, видове диференціювання.

Постановка проблеми. Хламідіози є групою інфекційних захворювань, що викликаються грамнегативними внутрішньоклітинними бактеріями порядку Chlamydiales. За сучасною класифікацією, прийнятою на II Європейському симпозиумі «Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications (EMAC-2)», до означеного порядку належить 8 родин (3 з яких мають статус кандидатів) представлених 13 родами (5 зі статусом кандидатів) і 25 видами (серед яких у статусі кандидатів перебувають 7 мікроорганізмів). Більшість родин бактерій порядку Chlamydiales є паразитами амеб, комах, риби. Окремі з них виділяються від ссавців, але їх патогенна роль наразі не є відомою. Патогенними для ссавців і птахів є бактерії родини Chlamydiales роду *Chlamydia*, а саме: *C. abortus*, *C. avium*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. gallinacea*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. suis* та *C. trachomatis* [2, 8].

На сьогодні в арсеналі гуманної і ветеринарної медицини існує низка діагностичних тест-систем для індикації хламідій, і ПЛР-тест-систем зокрема, але відсутні такі, що забезпечували б їх ди-

ференціювання за видами. Разом з тим, існує необхідність в таких діагностиках, перш за все, у наукових дослідженнях, під час вивчення штамів та ізолятів хламідій, а також різних аспектів хламідіозів тварин, зокрема у проведенні епізоотологічного моніторингу.

Метою роботи було розробити ПЛР-тест-систему для видового диференціювання 10 видів збудників зоонозних хламідіозів.

Матеріали та методи. Дослідження проводились в умовах лабораторій здоров'я тварин та генетики Інституту свинарства та агропромислового виробництва НААН.

Для конструювання дизайну праймерів ПЛР-тест-систем із баз даних нуклеотидних послідовностей «GenBank» (USA) було залучено 491 первинна послідовність гена, який кодує основний мембранний білок (МOMP), 10 видів бактерій роду *Chlamydia*, що є патогенними для тварин [1, 3, 4, 7].

Означені нуклеотидні послідовності гена, що кодує МOMP були вирівняні за допомогою програми «MEGA4» та «MEGA7» [6]. Для розроблення дизайну олігонуклеотидних праймерів були обрані індивідуальні для різних видів бактерій роду *Chlamydia* ділянки ДНК.

За допомогою комп'ютерної програми «FastPCR» було отримано дизайни олігонуклеотидних праймерів із параметрами температури їх відпаду [5]. З отриманих дизайнів праймерів було відібрано по одній парі (прямий і зворотний) для кожного виду хламідій. За розробленими дизайнами замовлено синтез олігонуклеотидних праймерів у фірмі «Thermo Electron Corporation» (Germany). Отримані синтезовані праймери розводили стерильною деіонізованою бідистильованою водою до стокової концентрації 100 pmol/μl, а потім до робочої концентрації 20 pmol/μl.

Окрім праймерів, у тест-системах використовували реагенти для ПЛР виробництва фірми

«Fermentas UAB» (Lithuania), а саме: деіонізовану воду, ПЛР-буфер, MgCl₂, розчин дезоксирибонуклеозидтрифосфатів (dNTP) та Таq-полімераза.

Полімеразну ланцюгову реакцію із застосуванням розроблених 10 пар олігонуклеотидних праймерів, що фланкують фрагменти гена МОРР *C. abortus*, *C. avium*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. gallinacea*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* та *C. suis* проводили в поліпропіленових мікроцентрифужних пробірках об'ємом 0,6 см³ на термоциклері «Biometra TRIO-Thermoblock» (Germany) в 25 мкл ПЛР-суміші.

Співвідношення реакційної суміші та програму ампліфікації підбирали дослідно-практичним шляхом до отримання найбільш чітких бендів на електрофореграмах.

Фракціювання продуктів ампліфікації здійснювали методом горизонтального електрофорезу у 2,0 % агарозному гелі в електрофоретичній камері «Cleaver Scientific Ltd.» (UK) із візуальною оцінкою на УФ-трансілюмінаторі виробництва НВО «Прогрес» (Україна), після фарбування бромистим етидієм.

Як маркер розміру ДНК використовували pUC19/MspI («Fermentas UAB», Lithuania).

Виділення ДНК із досліджуваних біологічних зразків проводили за допомогою комерційно доступного комплексу реагентів «ПРОБА-РАПІД» виробництва ООО «НПО ДНК Технология» (Россия).

Для відпрацювання параметрів ПЛР для розроблених тест-систем та їх випробування на аналітичну специфічність було використано 17 наступних біологічних матеріалів: зразок контрольної ДНК *C. abortus* (1); зразок контрольної ДНК *Chlamydia avium* (2); зразок контрольної ДНК *Chlamydia caviae* (3); зразок контрольної ДНК *Chlamydia felis* (4); зразок контрольної ДНК *Chlamydia gallinacea* (5); зразок контрольної ДНК *Chlamydia muridarum* (6); зразок контрольної ДНК *Chlamydia pecorum* (7); зразок контрольної ДНК *Chlamydia pneumoniae* (8); зразок контрольної ДНК *Chlamydia psittaci* (9); зразок контрольної ДНК *Chlamydia suis* (10); зразок контрольної ДНК *Chlamydia trachomatis* (11); зразок ДНК виділеної зі штаму лептоспіри (штам LSU, Серовар *louisiana*, серогрупа *Louisiana*) (12); зразок ДНК виділеної зі штаму лептоспіри (штам 493 Poland, Серовар *polonica*, серогрупа *Sejroe*) (13); зразок ДНК виділеної зі штаму лептоспіри (штам Hond Utrecht IV, Серовар *canicola*, серогрупа *Canicola*) (14); зразок ДНК виділеної з польового ізоляту *Babesia canis* від собаки мешканця м. Полтава (15); зразок ДНК виділеної з

польового ізоляту *Babesia bovis* від телиці приватного господарства с. Верхи Камінь-Каширського району Волинської області (16); зразок ДНК виділеної з польового ізоляту *Babesia divergens* від корови приватного господарства с. Сокилець Буцацького району Тернопільської області (17). Зразки контрольних ДНК отримані з лабораторії хламідіозу Інституту імені Фрідріха Льюфлера (Germany); зразки ДНК виділених з лептоспір, отриманих з музею мікроорганізмів лабораторії лептоспірозу Інституту ветеринарної медицини НААН; зразки ДНК виділених з бабезій, що зберігаються у лабораторії здоров'я тварин Інституту свинарства і АПВ НААН.

Результати досліджень. За допомогою комп'ютерної програми «FastPCR» отримано дизайни олігонуклеотидних праймерів. Зі значної кількості пар праймерів було обрано по одній для кожної тест-системи, з огляду на розмір ампліфікованої ділянки, що ними фланкується (найбільш зручної для електрофоретичної детекції) та на оптимальну температуру відпалу праймерів.

Таким чином, у ПЛР-тест-системі для видового диференціювання *C. abortus* використовується наступна пара праймерів:

ChAbMOMPL:

5'-GGATAGACCCAACATCGCTT-3'

та ChAbMOMPR:

5'-GGTTGAATGCCGCAGAACTA-3';

у тест-системі для видового диференціювання

C. avium – ChAvMOMPL:

5'-TTCTGGTGATCCTTGCGACC-3'

та ChAvMOMPR:

5'-GCTCCTAAAGTTGCACAACC-3';

у тест-системі для видового диференціювання

C. caviae – ChCavMOMPL:

5'-TATAAAGGGACAGCGGCAACTT-3'

та ChCavMOMPR:

5'-GCATCAAATGTAGCTCTGGACCA-3';

у тест-системі для видового диференціювання

C. felis – ChFelMOMPL:

5'-AACTGCAAGCAACA-CCACTG-3'

та ChFelMOMPR:

5'-CCAATCAATCCGACAAGGTT-3';

у тест-системі для видового диференціювання

C. gallinacea – ChGalMOMPL:

5'-CAATACCATGAATGGCAAGC-3'

та ChGalMOMPR:

5'-GAAAGTTGGGTTCCAAGCTG-3';

у тест-системі для видового диференціювання

C. muridarum – ChMuMOMPL:

5'-AGGTTTTCGGTGGAGATCCTT-3'

та ChMuMOMPR:

5'-AGCGGGATTCTCTCTTGATG-3';

у тест-системі для видового диференціювання *C. pecorum* – ChPecMOMPL:

5'-TCCAATACGCACAATCGAAA-3' та ChPecMOMPR 5'-GTAAGACAACGCTGCACCAA-3';

у тест-системі для видового диференціювання *C. pneumoniae* – ChPnMOMPL 5'-

GGAACAAAGTCTGCGACCAT-3' та ChPnMOMPR 5'-AAAGAAGGGTCCATGCAGTT-3';

у тест-системі для видового диференціювання *C. psittaci* – ChPsMOMPL:

5'-GCACTATGTGGGAAGGTGCT-3' та ChPsMOMPR:

5'-CCATTTGCTTCTGGCTGATT-3';

у тест-системі для видового диференціювання *C. suis* – ChSuMOMPL:

5'-TTCTTTGCAATGCTGCTGAA-3' та ChSuMOMPR:

5'-ATCAAAGCTTGCTCGAGACC-3'.

Продуктами ПЛР є фрагменти гена МOMP бактерій роду *Chlamydia*, що мають розміри специфічні для кожного з 10 видів хламідій, а саме: *C. abortus* – 158 пар нуклеотидів (п.н.), *C. avium* – 507 п.н., *C. caviae* – 179 п.н., *C. felis* – 201 п.н., *C. gallinacea* – 171 п.н., *C. muridarum* – 205 п.н., *C. pecorum* – 206 п.н., *C. pneumoniae* – 191 п.н., *C. psittaci* – 208 п.н., *C. suis* – 215 п.н.

Високу специфічність обраних праймерів підтверджено результатами біоінформаційних досліджень за допомогою сайту «Bio.bs.u.by» та комп'ютерної програми «Blast», оскільки розроблені олігонуклеотидні праймери є специфічними для того чи іншого виду хламідій і не проявляють компліментарності до інших мікроорганізмів та пріонних білків.

Оптимізація умов ПЛР передбачала підбір складу реакційної суміші та температурний режим ампліфікації.

У результаті відпрацювання протоколу ПЛР найкращими параметрами реакційної суміші виявились наступні – 2,5 мкл 10-кратного буферу (670 мМ Тріс-НСІ, рН 8,8 за температури 25 °С, 20 мМ БСА, 166 мМ амонію сірчаноокислого (NH₄)₂SO₄, 100 мМ 2-β-меркаптоетанол) («Fermentas UAB», Lithuania), 2,5 мкл 2,5 мМ dNTP («Fermentas UAB», Lithuania), 2 мкл 50 мМ MgCl₂ («Fermentas UAB», Lithuania), 2–3 од. Таq-полімерази (*Thermus aquaticus*) («Fermentas UAB», Lithuania), 0,5 мкл (0,1 опт. один.) кожного з праймерів, зразок досліджуваної ДНК 2 мкл (у концентрації 20 мкг/см³) та деіонізованої води до об'єму 25 мкл. На ампліфікаційну суміш нашаровували 25 мкл мінеральної олії.

Оптимальними параметрами ампліфікації виявились наступні: t 94 °С – 120 с (1 цикл); t 93 °С – 30 с, t 55 °С – 30 с, t 72 °С – 45 с (35 циклів); t 72 °С – 300 с (1 цикл).

На першій електрофореграмі ПЛР-продуктів означених 17 зразків біологічного матеріалу, досліджених за допомогою тест-системи для видового диференціювання *C. abortus*, було виявлено смугу розміром 158 п.н. на одній доріжці (№ 1), що відповідає зразку контрольної ДНК *C. abortus*. На інших 16 доріжках та доріжці негативного контролю будь-які смуги відсутні.

На другій електрофореграмі апліфікатів тих же 17 зразків біологічного матеріалу, досліджених за допомогою тест-системи для видового диференціювання *C. avium*, було виявлено смугу розміром 507 п.н. на одній доріжці (№ 2), що відповідає зразку контрольної ДНК *C. avium*. На інших 16 доріжках та доріжці негативного контролю будь-які смуги відсутні.

На третій електрофореграмі апліфікатів 17 означених біологічних зразків, досліджених за допомогою тест-системи для видового диференціювання *C. caviae*, було виявлено смугу розміром 179 п.н. на одній доріжці (№ 3), що відповідає зразку контрольної ДНК *C. caviae*. На інших 16 доріжках та доріжці негативного контролю будь-які смуги відсутні.

На четвертій електрофореграмі апліфікатів 17 вказаних біологічних зразків, досліджених за допомогою тест-системи для видового диференціювання *C. felis*, було виявлено смугу розміром 201 п.н. на одній доріжці (№ 4), що відповідає зразку контрольної ДНК *C. felis*. На інших 16 доріжках та доріжці негативного контролю будь-які смуги відсутні.

На п'ятій електрофореграмі апліфікатів 17 означених біологічних зразків, досліджених за допомогою тест-системи для видового диференціювання *C. gallinacea*, було виявлено смугу розміром 171 п.н. на одній доріжці (№ 5), що відповідає зразку контрольної ДНК *C. gallinacea*. На інших 16 доріжках та доріжці негативного контролю будь-які смуги відсутні.

На шостій електрофореграмі апліфікатів 17 означених біологічних зразків, досліджених за допомогою тест-системи для видового диференціювання *C. muridarum*, було виявлено смугу розміром 205 п.н. на одній доріжці (№ 6), що відповідає зразку контрольної ДНК *C. muridarum*. На інших 16 доріжках та доріжці негативного контролю, будь-які смуги відсутні.

На сьомій електрофореграмі апліфікатів 17 означених біологічних зразків, досліджених

за допомогою тест-системи для видового диференціювання *C. pecorum*, було виявлено смугу розміром 206 п.н. на одній доріжці (№ 7), що відповідає зразку контрольної ДНК *C. pecorum*. На інших 16 доріжках та доріжці негативного контролю будь-які смуги відсутні.

На восьмій електрофореграмі апліфікатів 17 означених біологічних зразків, досліджених за допомогою тест-системи для видового диференціювання *C. pneumoniae*, було виявлено смугу розміром 191 п.н. на одній доріжці (№ 8), що відповідає зразку контрольної ДНК *C. pneumoniae*. На інших 16 доріжках та доріжці негативного контролю будь-які смуги відсутні.

На дев'ятій електрофореграмі апліфікатів 17 означених біологічних зразків, досліджених за допомогою тест-системи для видового диференціювання *C. psittaci*, було виявлено смугу розміром 208 п.н. на одній доріжці (№ 9), що відповідає зразку контрольної ДНК *C. psittaci*. На інших 16 доріжках та доріжці негативного контролю будь-які смуги відсутні.

На десятій електрофореграмі апліфікатів 17 означених біологічних зразків, досліджених за допомогою тест-системи для видового диференціювання *C. suis*, було виявлено смугу розміром 215 п.н. на одній доріжці (№ 10), що відпо-

відає зразку контрольної ДНК *C. suis*. На інших 16 доріжках та доріжці негативного контролю будь-які смуги відсутні.

Дослідження 17 означених зразків ДНК за допомогою кожної з 10 ПЛР-тест-систем проводили у 3-х повторах, при цьому результати були аналогічними.

Таким чином, результати електрофореграм вказують на їх адекватність та на аналітичну специфічність розроблених ПЛР-тест-систем.

Висновок. Розроблені ПЛР-тест-системи, до складу яких входять олігонуклеотидні праймери, що фланкують різні за розміром фрагменти ДНК гена, який кодує МОМР 10 видів бактерій роду *Chlamydia*, дає можливість виявляти ДНК і диференціювати за видом *C. abortus*, *C. avium*, *C. caviae*, *C. galinaceae*, *C. muridarum*, *C. felis*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* та *C. suis*, що є збудниками хламідійних інфекцій ссавців і птахів.

Перспективами подальших досліджень є проведення валідації розроблених ПЛР-тест-систем з іншими тест-системами, випробування на польових ізолятах хламідій та відпрацювання алгоритмів проведення диференціювання бактерій роду *Chlamydia*.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Зоонозні хламідіози : [монографія] / [Ксьонз І. М., Скрипник В. Г., Нехороших З. М. і ін.]. – К., ДНДЛДВСЕ, 2014. – 229 с.
2. Ксьонз І. М. Зміни у класифікації хламідій / І. М. Ксьонз, В. Й. Любецький // Ветеринарна медицина України. – 2014. – №9 (223). – С. 11–16.
3. Лобзин Ю. В. Хламидийные инфекции / Ю. В. Лобзин, Ю. И. Ляшенко, А. Л. Позняк – СПб. : ООО «Издательство ФОЛИАНТ», 2003. – 400 с.
4. Самуйленко А. Я. Инфекционная патология животных : том V : Хламидиозы / А. Я. Самуйленко, В. Н. Сюрин, Е. С. Воронин. – М. : ВНИИТИБП, 2003. – 207 с.
5. Kalendar R. FastPCR software for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis / R. Kalendar, D. Lee, A. H. Schulman // Methods Mol Biol. – 2014. – V. 1116. – P. 271–302.
6. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. / [Tamura K. K., Dudley J., Nei M. et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2007. – V. 24. – P. 1596–1599.
7. Possible pathogenic interplay between *Chlamydia suis*, *Chlamydophila abortus* and PCV-2 on a pig production farm / [Schautteet K., Beeckman D. S., Delava P., Vanrompay D.] // Vet. Rec. – 2010. – Vol. 166, №11. – P. 329–333.
8. Sachse K. Neues aus dem NRL Chlamydiose / K. Sachse // Sekond European Meeting on [«Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications (EMAC-2)»], (Germany, Jena, 13–14 June 2013), Friedrich Löffler Institut. – 2013. – P. 95–96.